

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

SCHMIDT

Serial No. 09/295,302

Filed: April 21, 1999

For: AGENT FOR THE
MANUFACTURE OF
BIOLOGICAL PARTS...

Art Unit: ____

Examiner: ____

Atty Docket: 109572.0101

**SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT(S) and
CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §§ 119 and 120**Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document, a certified copy of which are enclosed. The documents were filed in a foreign country within the proper statutory period prior to the filing of the above-referenced United States patent application.

<u>Country</u>	<u>Priority Document Serial No.</u>	<u>Filing Date</u>
Germany	199 17 696.50	20 April 1999

Priority under 35 U.S.C. §120 is hereby claimed under U.S. Application Serial Nos. 08/350,666 and 07/849,083 which claim priority from German Application No. P3936568.9.

Acknowledgement of this claim and submission in the next official communication is respectfully requested.

Respectfully submitted,

KARL O. NEIDERT

Registration No. 39,313

BLANK ROME COMISKY & McCAULEY LLP

The Farragut Building
Suite 1000 - 10th Floor
900 17th Street, NW
Washington, DC 20006
(202) 463-7700

Date: July 26, 1999

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung



Herr Professor Dr. Dr. Karlheinz S c h m i d t in Gomaringen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mittel für die Herstellung biologischer Teile mit einem Wirkstoffkomplex und für diesen geeigneten Trägermaterialien"

am 20. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, A 61 K und A 61 F der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Juni 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Agurks

Aktenzeichen: 199 17 696.50.

5

Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt
Äußere Weiler Str. 12
72810 Gomaringen

10

Mittel für die Herstellung biologischer Teile mit einem Wirkstoffkomplex
und für diesen geeigneten Trägermaterialien

15

20

25

Die Erfindung betrifft ein Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, das unter anderem einen Wirkstoffkomplex aufweist, mit den folgenden, voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische Teil spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und mindestens einer Wachstums- und/oder Maturationskomponente.

30

Im Stand der Technik ist bereits ein Wirkstoffkomplex für die Herstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, mit den genannten Komponenten bekannt. Bei diesem bekannten Wirkstoffkomplex kann die Strukturkomponente beispielsweise aus verschiedenen Collagenen, Elastin oder Proteoglycanen bestehen. Als Rekrutierungskomponente für diesen Wirkstoffkomplex

sind insbesondere Chemotaktica zu nennen, beispielsweise Peptide, wie N-F-Met-Leu-Phe- und/oder beispielsweise Metabolite der Arachidonsäure, wie Leukotriene. Die Aufgabe der Adhäsionskomponente können Eiweißkörper vom Typ des Fibronectins oder Laminins, aber auch Zell-Adhäsions-Moleküle, wie L-CAM, N-CAM und Matrix-Adhäsions-Moleküle, wie Cytotactin, Tenascin, Collagen Typ IV, V, VII, synthetische Peptide und Transmembran-Verbindungsproteine, wie Integrin, erfüllen. Die zunächst genannten Beispiele für Adhäsionskomponenten, Fibronectin und Laminin, sind für die Zwecke des hier erläuterten Wirkstoffkomplexes in den Bereich der Matrix-Adhäsions-Moleküle einzuordnen. Als weitere Komponente weist der genannte Wirkstoffkomplex mindestens eine Wachstums- und/oder Maturationskomponente auf, vorzugsweise in Form eines oder mehrerer Cytokine. Beispiele für solche Cytokine sind bei der Herstellung von Blut die Kolonie-stimulierenden Faktoren, bei der Herstellung von Bindegewebe der Fibroblasten Wachstumsfaktor, bei der Herstellung von Haut der epidermale Wachstumsfaktor, bei der Herstellung von Knorpel der Knorpel induzierende Faktor, bei der Herstellung der Milz oder der Lymphknoten der Lymphocyten aktivierende Faktor sowie Milzpeptide, für die Herstellung von Thymus der T-Zellen Wachstumsfaktor sowie Thymuspeptide, für die Herstellung von Knochen der Knochen-Wachstumsfaktor sowie der transformierende Wachstumsfaktor, für die Herstellung von Blutgefäßen der Angiogenese-Faktor. Ferner finden noch die folgenden Cytokine Verwendung: Interleukine, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren, der Tumor-Nekrose-Faktor, Prostaglandine, Leukotriene, transformierende Wachstumsfaktoren, von Thrombocyten abstammender Wachstumsfaktor, Interferone sowie von Endothelzellen abstammender Wachstumsfaktor.

Näheres über diesen Wirkstoffkomplex ist aus dem deutschen Patent DE 39 36 568.9 zu entnehmen, dessen Offenbarungsgehalt hier ausdrücklich einbezogen wird.

Um für die Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen verwendet werden zu können, muß dieser Wirkstoffkomplex höchstrein vorliegen. Die Herstellung dieses Wirkstoffkomplexes ist daher sowohl zeitintensiv als auch kostspielig.

lig. Um z. B. Knochendefekte mittels dieses Wirkstoffkomplexes wieder mit Knochen aufzufüllen, bedarf es einer den gesamten Knochendefekt ausfüllenden Menge des Wirkstoffkomplexes. Es ist daher nachteilig, daß der Wirkstoffkomplex zwar höchstwirksam, seine Anwendung jedoch sehr teuer ist.

5

Wenn größere Knochendefekte auszufüllen sind, muß das eingebrachte Implantat, bestehend aus dem Wirkstoffkomplex außerdem eine ausreichende Eigenfestigkeit haben, um durch die umgebenden Weichgewebe nicht komprimiert zu werden. Der Wirkstoffkomplex hat nach seiner Herstellung zunächst eine watteartige Konsistenz. Er muß daher für die genannte Anwendung entweder komprimiert werden, was zu einer höheren mechanischen Festigkeit, aber auch zu einem hohen Materialverbrauch führt, oder es muß ein ausreichend stabiles Trägermaterial zusammen mit dem Wirkstoffkomplex eingesetzt werden. Die Kombination eines Trägermaterials mit dem Wirkstoffkomplex ist jedoch keinesfalls unproblematisch. Nach den bisher zur Verfügung stehenden Erkenntnissen über den Wirkstoffkomplex und seine komplexe Wirkungsweise ist zumindest eine Beeinträchtigung der Bildung oder Wiederherstellung des jeweiligen zu behandelnden biologischen Teils, z. B. der knöchernen Regeneration, zu befürchten. Auch die Gefahr einer gewebe-toxischen Reaktion wurde vermutet.

10

15

20

Außerdem sind Anwendungen des Wirkstoffkomplexes bei Krankheiten oder Defekten bisher nicht möglich, bei denen das aus dem Wirkstoffkomplex bestehende Implantat so hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt wird, daß auch die mechanische Festigkeit eines komprimierten Materials nicht ausreichen kann.

25

Davon ausgehend lag der vorliegenden Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein kostengünstigeres Mittel bereitzustellen, mit welchem zugleich eine hohe mechanische Festigkeit erreicht wird.

30

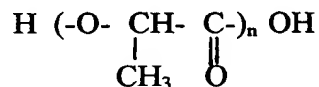
Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Mittel, bei dem ein Träger mit dem genannten Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder den Wirkstoffkomplex aufweist.

Die Lösung der Aufgabe lag schon deshalb nicht nahe, weil es, wie bereits erläutert, durchaus problematisch ist, eine Kombination des Wirkstoffkomplexes mit einem Träger, mit dem der Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder den er aufweist, vorzusehen, weil dann die Einheilung des Wirkstoffkomplexes, beispielsweise in den Knochendefekt gestört sein oder zumindest durch mögliche Immunreaktionen kompliziert werden könnte.

An mögliche Trägermaterialien werden bestimmte Anforderungen gestellt. Es können grundsätzlich als Trägermaterialien solche verwendet werden, die formbar sind und zumindest zu Beginn eine gewünschte Form- und Dimensionsstabilität aufweisen, wobei sich nach der Implantierung im Organismus ein kontrollierter Form- und Härteverlust ergeben kann. Für bestimmte Anwendungen müssen sie außerdem komplett resorbierbar sein und grundsätzlich dürfen sie nur eine geringe Toxizität aufweisen. Dies gilt nicht nur für das Trägermaterial selbst, sondern auch für dessen Abbauprodukte. Dabei ist unter dem Begriff der Toxizität nicht nur eine akute toxische Gewebereaktion zu verstehen, sondern es müssen auch subakute Wirkungen, wie z. B. karzinogene und immunologische Effekte einbezogen werden.

Der erfindungsgemäß mit dem Wirkstoffkomplex kombinierte Träger kann aus polymeren, keramischen, metallischen oder nichtmetallischen Trägermaterialien bestehen. Bei den polymeren Trägermaterialien kommen insbesondere Polymere aus natürlichen Monomeren, wie Polyaminosäuren (Polylysin), Polyglutaminsäure, etc.) und Polymere der Milchsäure in Betracht. Es können auch Copolymere z. B. aus Polymilchsäure und Hydroxyessigsäure verwendet werden.

Polylaktate sind Polyester der Milchsäure mit der chemischen Formel:



Bei der direkten Polymerisation der Monomere ergeben sich Polymere mit relativ niedrigen Molekulargewichten. Die obere Grenze liegt etwa bei 20000 Da. Höhere Molekulargewichte können durch die Verknüpfung zyklischer Dimere bei hoher

Temperatur, geringem Druck und in Gegenwart von Katalysatoren entstehen. Die Milchsäurepolymere sind bioabbaubar, biokompatibel, wasserunlöslich und zeichnen sich durch eine große Festigkeit aus.

5 Des weiteren können verschiedene Collagene als Trägermaterial verwendet werden. Hierbei sind insbesondere die Collagene vom Typ I, IV, V, VII zu nennen. Die Collagene können beispielsweise in Form von Vliesen oder Gelen eingesetzt werden und weisen insbesondere eine an sich gute immunologische Verträglichkeit in Verbindung mit einer problemlosen Verarbeitung auf.

10

Unter den keramischen Trägermaterialien sind insbesondere Glaskeramiken zu nennen, insbesondere Calciumphosphatkeramiken, Aluminiumoxidkeramiken und Hydroxylapatitkeramiken.

15 Die Calciumphosphatkeramiken basieren auf dem System $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$. Auf der Basis dieses Systems existieren fünf verschiedene binäre Verbindungen. Dabei haben sich Tricalciumphosphat (TCP) und Tetra calciumphosphat für die Zwecke der vorliegenden Erfindung als ein geeignetes Trägermaterial erwiesen.

20 TCP wird durch Pressen und anschließendes Sintern der Ausgangsmaterialien Calciumoxid (CaO) und Diphosphorpentoxid (P_2O_5) hergestellt. Alternativ kann es auch in einem Arbeitsschritt durch Heißpressen hergestellt werden. Aus TCP hergestellte Trägermaterialien können in Form von Platten oder Scheiben und als Granulat eingesetzt werden.

25

Tetra calciumphosphat wird ähnlich wie TCP in zwei Schritten hergestellt, indem zunächst die Ausgangsstoffe auf Kristallgitterabstände von 5 bis 10 μm verdichtet und die Masse dann bei 1100 bis 1500°C gebrannt wird.

30 Hydroxylapatit wird durch keramisches Brennen von Pentacalciumhydroxid-Triphosphatpulver bei 1250°C gewonnen. Außerdem kann zur Herstellung einer Hydroxylapatitkeramik auch ein natürliches Material herangezogen werden, wie

das carbonatische Skelett der Rotalge. Dabei werden nach einem Wasch- und Trocknungsvorgang zunächst die organischen Bestandteile durch Pyrolyse bei einer Temperatur von etwa 700°C entfernt. Dann erfolgt die Umsetzung zu Hydroxylapatit unter Hinzufügung von Phosphatlösung bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur.

Bei einem weiteren Herstellungsverfahren einer Hydroxylapatitkeramik, ausgehend von dem natürlichen Skelett von Korallen, wird das Calciumcarbonat der Korallen durch hydrothermale Umwandlung in Hydroxylapatit oder eine Mischung aus Hydroxylapatit und weiteren mineralischen Strukturen umgewandelt. Bei dem so entstehenden Material bleibt die koralline Struktur, d. h. insbesondere das interkonnektierende Porensystem der Koralle, erhalten.

Aluminiumoxidkeramiken, die polykristallin aufgebaut sind, enthalten zu etwa 99,7 % Aluminiumoxid sowie geringe Anteile an Magnesiumoxid und/oder Zirkonoxid. Sie werden nach Vorverdichtung unter hohem Druck bei Temperaturen von etwa 1500 bis 1800°C zu einem Festkörper gesintert. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wurden mikroporöse Aluminiumoxidkeramiken verwendet. Auch monokristalline Formen (Saphire) können zur Anwendung kommen.

Als weiteres können sogenannte ionische Polymere als Trägermaterialien verwendet werden, für die die Bezeichnung "Ionomer" gebräuchlich ist und die im folgenden auch hier verwendet wird. Dabei ist z. B. Ionomerzement zu nennen, der durch Reaktion von Glaspulver mit einer Polyalkensäure entsteht. In einer Abwandlung kann dem Glaspulver zusätzlich Calciumcarbonat als Schaumbildner zugesetzt werden. Bei der Reaktion des Glaspulvers und des zugesetzten Calciumcarbonats mit der Polyalkensäure wird CO₂ freigesetzt, was die Porosität bewirkt.

Ionomerzement ist grundsätzlich ein Zweikomponentensystem und entsteht durch die Reaktion eines Glaspulvers (Calcium-, Aluminium-, Fluor-, Silikat-Glas) mit einer Polyalkensäure (hoch-molekulares Mischpolymerisat aus Maleinsäure und Acrylsäure). Der Ablauf der zementbildenden Reaktion wird durch Einwirkung der Polyalkensäure auf die basischen Glaspartikel in Gang gesetzt. Hierbei dient Wasser

als Reaktionsmedium. Neben der Polyalkensäure besteht die flüssige Komponente des Reaktionssystems außerdem aus Weinsäure. Durch den Einsatz dieser Weinsäure wird die Abbindegeschwindigkeit des Zementes gesteuert.

- 5 Ionomerzement gilt als gewebeverträglich und ist im biologischen Milieu dauerhaft stabil. Er ist außerdem plastisch formbar. Der für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendete Ionomerzement ist frei von Beimengungen in Form von Pigmenten, Farbstoffen oder Metallsalzen. Er ist außerdem frei von monomeren, ungesättigten Carbonsäuren, wie z. B. Acryl- und Maleinsäure und wird steril und
- 10 pyrogenfrei verwendet.

- Unter den metallischen Trägermaterialien ist vor allen Dingen Titan, auch in Form von Legierungen, zu nennen. Dabei wurde insbesondere eine Legierung aus den Komponenten Titan, Aluminium und Vanadin untersucht. Die metallischen Träger
- 15 können in Form von Plättchen, welche außerdem Gitterstruktur aufweisen können, aber auch in Form von zylindrischen Hohlkörpern mit Gitterstruktur eingesetzt werden.

- Weitere metallische Trägermaterialien stehen in Form von Endoprothesen zur
- 20 Verfügung, bei welchen durch Beschichtung und/oder Befüllen mit dem Wirkstoffkomplex ein schnelleres und dauerhaftes Einwachsen der Endoprothesen im Organismus ermöglicht werden soll.

- Die Endoprothesen bilden daher eine besondere Form des erfindungsgemäßen Trägers. Durch ein beschleunigtes Einwachsen an der implantierten Stelle und gleichzeitig ein verbessertes Einwachsen desselben kann wiederum eine längere Haltbarkeit und größere sowie zeitliche frühere Belastbarkeit der Endoprothese resultieren.
- 25

- 30 Als nichtmetallisches Trägermaterial ist vor allen Dingen Kohlenstoff zu nennen, der in Form sogenannter "Carbonkäfige" eingesetzt werden kann, welche zylindrische Hohlkörper bilden. Sowohl die Titan (Hohl) Körper als auch die Carbonkäfige

werden mit dem Wirkstoffkomplex befüllt, während die in Plättchen- oder Granulatform vorliegenden sonstigen Trägermaterialien in der Regel mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet werden.

5 Die genannten Titanhohlkörper und Carbonkäfige können, wenn sie mit dem Wirkstoffkomplex befüllt worden sind, zur Herstellung, Wiederherstellung oder Stabilisierung von Wirbelkörpern verwendet werden. Damit ergibt sich die einzigartige Möglichkeit, Defekte an Wirbeln oder zerstörte Wirbel der Wirbelsäule wiederherzustellen. Mit dem bisherigen Wirkstoffkomplex war dies deshalb nicht möglich,
10 weil dieser der mechanischen Belastung innerhalb der Wirbelsäule nicht Stand gehalten hätte. Die nun mit dem Wirkstoffkomplex befüllten Hohlkörper oder Käfige schaffen die mechanische Stabilität, ohne jedoch immunologische Gegenreaktionen oder eine verschlechterte Wirksamkeit des Wirkstoffkomplexes nach sich zu ziehen.

15

Außerdem kann das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudoarthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur Einheilung von Endoprothesen verwendet werden.

20

Bei den Knochendefekten, die mit dem erfindungsgemäßen Mittel erfolgreich behandelt wurden, gehören z. B. die Gehörknöchelchenkette, der Wiederaufbau der Stirnhöhle, des Siebbeindaches und die Verwendung als Dentalimplantat.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

25

I. Herstellung des Wirkstoffkomplexes

Im folgenden werden die wesentlichen Herstellungsschritte des Wirkstoffkomplexes beschrieben:

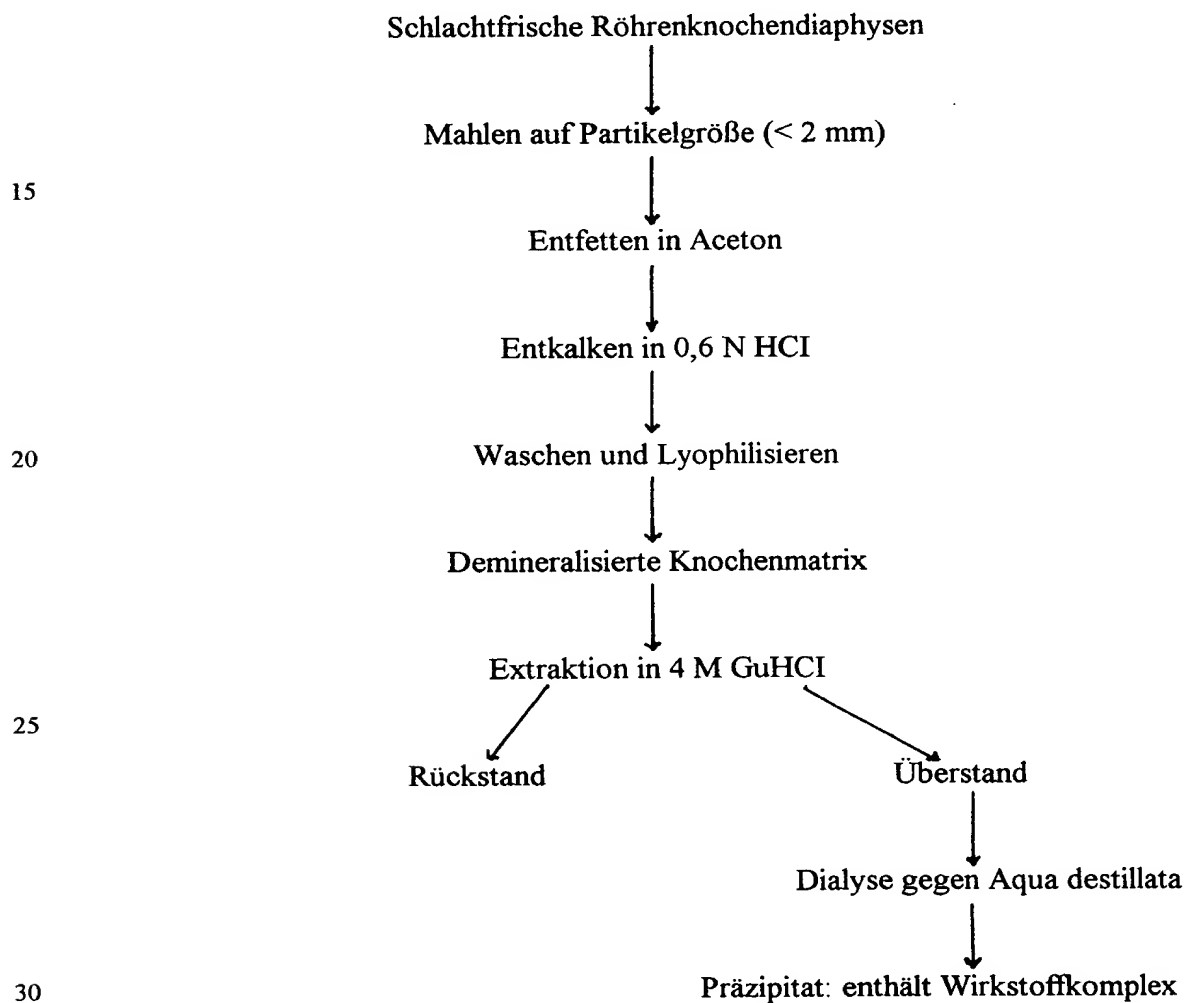
30

Röhrenknochen von Kälbern, Schafen, Kaninchen oder Ratten wurden gesäubert und unter anderem vom Knochenmark befreit und dann eingefroren. Der gefrorene Knochen wird auf eine Partikelgröße von weniger als 2 mm zerkleinert. Die zer-

kleinerten Knochenstücke wurden in Aceton entfettet und in 0.6 N Salzsäure entkalkt. Danach wird lyophilisiert und man erhält eine demineralisierte Knochenmatrix, die in 4 molarer Guanidinium-HCl-Lösung extrahiert wird. Die Extraktionslösung wird gegen Aqua dest. dialysiert und der Wirkstoffkomplex durch Abzentrifugieren und Lyophilisieren im Präzipitat erhalten.

Diese grundsätzliche Herstellungsweise ist im nachfolgenden Flußdiagramm nochmals dargestellt.

Abb.1: Flußdiagramm zur Herstellung des Wirkstoffkomplexes



II. Wirksamkeit des Wirkstoffkomplexes ohne Verwendung von Trägermaterialien

Um zu zeigen, daß der Wirkstoffkomplex als solches wirksam ist, wird zunächst
5 ein Versuch dargestellt, bei dem der Wirkstoffkomplex ohne weitere Trägermaterialien implantiert wird.

1. Für den Versuch verwendete Tiere

Es werden weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla mit einem mittleren Körper-
10 gewicht von 3089 g verwendet. Sie erhielten Haltungsfutter für Kaninchen und mit Salzsäure auf pH 4,5 angesäuertes doppelt ozoniertes Leitungswasser nach Bedarf.

Die Tiere wurden durch Subcutaninjektion eines Gemisches von Ketamin und Xylazin narkotisiert.

15

2. Vorbereitung eines Knochendefektes bei den Kaninchen

Mit einem innen gekühlten Bohrer wurde ein Implantatlager von 4 mm Durchmesser und circa 9 mm Tiefe im Kniegelenk (distales Femurende) des Kaninchens präpariert. Dann wurde das so gebildete Bohrloch jeweils mit 30 und 90 mg des Wirkstoffkomplexes gefüllt, der hergestellt worden war, wie unter I. beschrieben. Je-
20 weils ein weiteres Bohrloch diente in Form eines "Leerloches" zur Kontrolle der Knochenneubildung.

Figur 1 zeigt die Knochenneubildung im Leerloch und im Bohrloch nach Implantation des Wirkstoffkomplexes sowie die Dichte der umgebenden präexistenten Spongiosa jeweils 28 Tage nach der Operation (n=2/Wirkstoff-Menge).
25

Bei der Auswertung der Versuche wurde festgestellt, daß die Dichte der die Bohrlöcher umgebenden Spongiosa nach Implantation von 30 mg des Wirkstoffkomplexes um 45 % und nach Implantation von 90 mg des Wirkstoffkomplexes um 69 % höher lag als beim Leerloch. Dabei hatte die Menge an präexistenter Spongiosa keinerlei Einfluß auf die Regeneration im Defekt, da die Knochenneubildung
30

bildung nach der Insertion des Wirkstoffkomplexes nicht von der Bohrlochperipherie ausging, sondern gleichmäßig über den Defekt verteilt war.

5 **III. Knochenbildung im Unterkiefer von Schafen unter Verwendung von Tricalciumphosphat (TCP)**

1. Für die Versuche verwendete Tiere

10 Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden ausgewachsene Hausschafe von der Viehzentrale Südwest AG Stuttgart verwendet. Diese erhielten Heu und Wasser als Ernährung sowie drei Tage vor dem operativen Eingriff einen Brei aus Altromin-Pellets.

Die Tiere wurden mit 1 ml Xylazin/1ml Ketanest i. m. prämediziert. Dann wurden die Schafe mit Nembutal narkotisiert.

15

2. Vorbereitung des Implantats

20 TCP wurde in einer Lösung von 100 mg gelöstem Wirkstoffkomplex mit 10 ml Wasser suspendiert und unter ständigem Rühren mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach 24-stündigem Lyophilisieren und anschließender Gassterilisation (Ethylenoxid) wurde das so mit dem Wirkstoffkomplex dotierte TCP in den nachfolgend beschriebenen Unterkiefer-Defekt eines Schafes eingebracht. Außerdem wurde ein weiterer Unterkiefer-Defekt, der als Vergleich diente, mit undotiertem, im Autoclaven sterilisiertem TCP gefüllt.

25 3. Vorbereitung des Unterkiefer-Defektes beim Schaf

In einem entsprechend vorbereiteten Unterkiefer eines Schafes wurde unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung mittels eines Trepanbohrers von 5 mm Durchmesser jeweils ein normierter Knochenzylinder herausgefräßt und entfernt. Dann wurde eines der so gebildeten Bohrlöcher mit TCP, das gemäß der Versuchsvorschrift 1. mit dem Wirkstoffkomplex dotiert worden war, befüllt und das
30 zweite Bohrloch mit undotiertem TCP aufgefüllt.

Die Ergebnisse des Knochenwachstums in den Unterkieferdefekten sind in Fig. 2 zur Erleichterung der Übersicht grafisch dargestellt. Die Versuchsdauer betrug 26 bzw. 41 Tage.

5 Es zeigte sich, daß durch die Dotierung von TCP mit dem Wirkstoffkomplex eine Beschleunigung der knöchernen Regeneration des Unterkieferdefektes der beiden Schafe Nr. 811 und 86 in der Anfangsphase von etwa 100 % erreicht wurde. Nach 41 Tagen betrug die Steigerung der Beschleunigung der knöchernen Regeneration immer noch 10 %. Die Knochenheilung verläuft daher besonders am Beginn deut-
10 lich schneller als ohne die osteoproduktive Wirkung der mit dem Wirkstoffkomplex dotierten Implantate.

Diese Erkenntnis ist insbesondere für die Beschichtung von Endoprothesen mit dem Wirkstoffkomplex von Bedeutung. Eine mit dem Wirkstoffkomplex beschichtete Endoprothese, beispielsweise im Fall eines Oberschenkelhals-Bruches,
15 ermöglicht entsprechend ein schnelleres Einwachsen der Prothese und damit eine schnellere Regeneration und Rekonvaleszenz des jeweiligen Patienten. Dadurch wird die Dauer des Krankenhausaufenthaltes verkürzt.

IV. Versuche mit Collagenen als Trägermaterialien

20

Der bereits bekannte, weiter oben erläuterte Wirkstoffkomplex kann zur Behandlung der Osteoporose, von Pseudoarthrosen, der Einheilung von Endoprothesen und zur Auffüllung großer Knochendefekte verwendet werden. Bei der Herstellung des Wirkstoffkomplexes ist der mengenmäßige Ertrag in dem erforderlichen Rein-
25 heitsgrad sehr gering. Daher wurde untersucht, ob es Trägermaterialien gibt, die mit dem Wirkstoffkomplex kombiniert werden können, um so die Menge des für die jeweilige Zielsetzung benötigten Wirkstoffkomplexes reduzieren zu können, ohne dadurch seine knochenbildende Wirksamkeit zu verringern.

1. Wirkstoffkomplex

Der für die Zwecke der nachfolgend beschriebenen Versuche verwendete Wirkstoffkomplex wurde genauso hergestellt wie unter I. beschrieben, wobei Röhrenknochen von Kälbern verwendet wurden.

5

2. Versuchstiere

Es wurden männliche Wistarratten eines Gewichtes zwischen 350 und 400 g verwendet und in einem klimatisierten Tierstall bei 23° C und etwa 50 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Ernährt wurden sie mit einer Haltungsdiät für Ratten und Mäuse.

10

Jedem untersuchtem Tier wurden zwei Implantate desselben Trägermaterials in die Bauchmuskulatur eingebracht, von denen eins mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet war, während das andere als Vergleichsimplantat unbeschichtet blieb. Die Tiere wurden nach 21 Tagen getötet und die betreffenden Areale der Implantate in der Bauchmuskulatur explantiert und histologisch ausgewertet.

15

3. Verwendete Trägermaterialien

Für diese Versuche wurden Collagenmaterialien eingesetzt, die alle käuflich zu erwerben sind. Collagen A war ein reines, steriles, natives, resorbierbares Rinderhautcollagen, das frei ist von jeglichen Fremdzusätzen, wie Stabilisatoren oder Desinfizienzien.

20

Collagen B war ein gereinigtes, lyophilisiertes, leicht quervernetztes steriles und nicht pyrogenes Rinderhautcollagen mit schwachen antigenen Eigenschaften. Die helikale Struktur des Collagens blieb erhalten.

25

Collagen C bestand aus reinen, nativen und resorbierbaren Rindercollagenfibrillen.

Alle verwendeten Collagene lagen in Vließform vor. Es wurden Collagenvliesstücke von je 50 mg abgeschnitten und je 1 ml der Wirkstoffkomplex-Lösung (3mg/ml) zugegeben. Bei den Kontrollimplantaten wurde stattdessen 1 ml destillierten Wasser zugegeben. Die so behandelten Collagenvliesstücke wurden bei -20° C eingefroren, lyophilisiert und ergaben Implantate mit einem Durchmesser von etwa 10

30

mm und einer Dicke von etwa 5 mm. Fig. 3 zeigt die Ergebnisse der Knochenbildung der Collagenimplantate A, B und C in mit und ohne Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex (Cyclosporin A) immunsupprimierten Tieren als auch nicht immunsupprimierten Tieren nach 21 Tagen. Dabei entspricht die Bewertungszahl (BZ) dem arithmetischen Mittel der Bewertungszahlen von drei unabhängigen Personen bei sechs Implantaten jeder Gruppe.

Mit dem Wirkstoffkomplex beschichtetes Collagen A zeigte nach dieser Zeit bei immunsupprimierten Tieren einen knochenbildenden Effekt, während dieser bei Collagen B nicht nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber zeigte jedoch Collagen C einen sehr ausgeprägten knochenbildenden Effekt.

IV. Prüfung von Trägermaterialien auf ihre Biokompatibilität

In Versuchen, die die Verbesserung der Langzeitstabilität von Endoprothesen betrafen, wurden Titanplättchen mit unterschiedlicher Rauigkeit (100, 20 und 0,5 μm), eine TiAl_6V_4 -Legierung (0,5 μm) und Al_2O_3 Plättchen der Firma Friedrichsfeld sowie Hydroxylapatit-Plättchen von der Feldmühle AG eingesetzt.

Die Beschichtungen mit dem Wirkstoffkomplex, welcher nach dem weiter oben angegebenen allgemeinen Verfahrensschema hergestellt worden war, wurden durch das Beschichtungsverfahren "Dip-coating" aufgebracht. Unter "Dip-coating" wird ein Beschichtungsverfahren verstanden, bei dem der zu beschichtende Gegenstand, hier die Plättchen, in eine Lösung mit einer gewünschten, vorgegebenen Konzentration des Beschichtungsmittels, hier des Wirkstoffkomplexes, getaucht wird. Anschließend wird lyophilisiert. Es werden dünne Überzugsschichten bzw. Beschichtungen erhalten. Die Prüfung der angegebenen Materialien auf ihre Biokompatibilität wurde insbesondere in Bezug auf die Rauigkeit der Oberflächen durchgeführt ($n=20$; je vier Plättchen).

Tabelle 1:

Trägermaterial	Anzahl lebender Zellen/cm ²	Anzahl toter Zellen/cm ²
Hydroxylapatit		
0,2 - 0,5 µm	1792 ± 700	200 ± 37
20 µm	7469 ± 2614	2238 ± 715
50 µm	4477 ± 408	1692 ± 427
Osprovit (Feldmühle)	7930 ± 2007	1638 ± 377
Titan 0,5 µm	11377 ± 2538	1054 ± 308
20 µm	9600 ± 3038	1754 ± 439
100 µm	2308 ± 669	2085 ± 623
TiAl ₆ V ₄ 0,5 µm	7200 ± 1062	2800 ± 954
Al ₂ O ₃ reinst, poliert	11446 ± 1500	2292 ± 600

Bei dieser Biokompaktibilitätsprüfung der untersuchten Materialien zeigte sich, daß Titan aufgrund der höchsten Anzahl lebender Zellen sowie den besten Verhältnis lebender : toter Zellen als Trägermaterial sehr geeignet ist. Während Hydroxylapatit ein ähnlich gutes Ergebnis lieferte schnitt TiAl₆V₄ erheblich schlechter ab.

Generell zeigte sich in Bezug auf die Oberflächenrauigkeiten, daß die glattesten Oberflächen (0,2 - 0,5 µm), mit Ausnahme von TiAl₆V₄, die besten Resultate lieferten. Mit Zunahme der Rauigkeit sinken sowohl die Anzahl lebender Zellen als auch das Verhältnis lebender : toter Zellen.

Die Ergebnisse dieser Versuche konnten nun auf die Beschichtung von Endoprothesen mit dem Wirkstoffkomplex, aber auch auf die Beschichtung formstabiler Käfige übertragen werden.

Vor dem Einsetzen der jeweiligen Endoprothesen wurden diese nach dem Verfahren das "Dip-coatings" mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet und zusätzlich wur-

de der Wirkstoffkomplex in die inneren Hohlräume des jeweiligen Prothesenschaftes, die Austritte an die Schaftoberfläche haben, eingeführt. Dadurch ergibt sich für zukünftige mögliche Lockerungen der Endoprothesen der Vorteil, daß nachträglich der Wirkstoffkomplex ohne einen größeren Eingriff aufgebracht werden kann und
 5 dort zu einer Knochenbildung und damit Verfestigung der Endoprothese führt.

Das die Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex zu höheren Belastungsmöglichkeiten, im Vergleich zu nicht beschichteten Oberflächen führt, zeigt Tabelle 2 am Beispiel von Hydroxylapatit (HA). Dabei wurden die Zugfestigkeiten an der
 10 Grenzfläche verschiedener Implantatmaterialien in $\text{N/mm}^2 \pm$ Standardabweichung bestimmt. Als Material wurde mittels heiß isostatischem Pressen (HIP) hergestellter Hydroxylapatit gegenüber zusätzlich mit dem Wirkstoffkomplex beschichtetem Hydroxylapatit bestimmt. Das Implantatmaterial wurde in das distale Kaninchenfemur implantiert und nach 84 Tagen untersucht. Die dabei aufgefundenen Zugfestigkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.
 15

Tabelle 2

Material	RT (μm)	Tage	n	Zugfestigkeit
HA HIP	0,5	84	10	$1,53 \pm 0,24$
HA HIP WK	0,5	84	6	$2,27 \pm 0,31$

20 n= Anzahl der Implantate
 WK= Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex
 HIP= heiß isostatisches Pressen
 RT= Oberflächenrauigkeit

25 V. Titankörper und Carbonkäfige

Nachdem die unter IV. dargestellten Untersuchungen die grundsätzliche Biokompatibilität des Titans nachwiesen, ergab sich eine besondere Anwendungsmöglichkeit des Wirkstoffkomplexes in formstabilen Käfigen aus Titan zur Verblockung
 30 von Wirbelkörpern. Außerdem zeigten sich hierfür auch Kohlenstoffkäfige, so-

nannte "carbon cages" als geeignet. Eine Verblockung von Wirbelkörpern ist häufig erforderlich, wenn durch degenerative Prozesse an den Bandscheiben, Tumoren oder Metastasen in den Wirbelkörpern der Wirbelsäule oder auch durch Osteoporose die Tragfähigkeit der Wirbelsäule beeinträchtigt ist, so daß entweder Wirbelfrakturen oder Nervenläsionen drohen. In diesen Fällen ist es erforderlich, die Kontinuität der Wirbelsäule über ein mechanisch stabiles Implantat, wie den Titankörper oder Kohlenstoffkäfig zu sichern. Die erforderliche knöcherne Überbrückung konnte bislang nur durch in einem Zweiteingriff gewonnene autologe Spongiosa versucht werden, was eine Reihe von Problemen beinhaltet, wie z. B. den Zweiteingriff und das damit verbundene Operationsrisiko, die begrenzte Menge an gewinnbarer Spongiosa Komplikationen an der Entnahmestelle, wie Infektionen oder chronische Schmerzzustände.

Durch die Befüllung der Titankörper oder Kohlenstoff-Käfige mit dem Wirkstoffkomplex konnte in kurzer Zeit eine knöcherne Überbrückung gesichert werden, ohne autologe Spongiosa zu benötigen. Dabei sind sowohl der Titankörper als auch der Carbon-Käfig als Hohlkörper mit Gitterstruktur aufgebaut. Diese Gitterstruktur erlaubt eine rasche Vaskularisierung auch im Inneren der formstabilen Komponente, so daß der Wirkstoffkomplex seine Aktivität entfalten kann und die Knochenbildung über das gesamte erforderliche Volumen eintritt, ohne das mechanische Kräfte die Form des neugebildeten Knochen beeinträchtigen. Neben der Verwendung im Bereich der Wirbelkörper kann ein solcher Titankörper oder Kohlenstoff-Käfig auch an beliebigen anderen Implantationsorten verwendet werden, wie z. B. im Kiefer und an Röhrenknochen.

Ein mit dem Wirkstoffkomplex befüllter Titankörper ist in Fig. 4 dargestellt.

Patentansprüche

- 5 1. Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, bei dem ein Träger mit einem Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder einen Wirkstoffkomplex aufweist und dieser Wirkstoffkomplex die folgenden, voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische
- 10 Teil spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und mindestens einer Wachstums- und/oder
- 15 Maturationskomponente, aufweist.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus polymeren, keramischen, metallischen oder nichtmetallischen Trägermaterialien besteht.
- 20 3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die polymeren oder keramischen Trägermaterialien ausgewählt sind aus Hydroxylapatit-, Calciumphosphat-, Aluminiumoxid- und Polylaktatmaterialien sowie Ionomerzement.
- 25 4. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das metallische Trägermaterial ausgewählt ist aus Titan oder einer Titan-Legierung.
- 30 5. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das nichtmetallische Trägermaterial ausgewählt ist aus Kohlenstoff.

6. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung, Wiederherstellung oder Stabilisierung von Wirbelkörpern.
- 5 7. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudoarthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur Einheilung von Endoprothesen.

Fig. 1

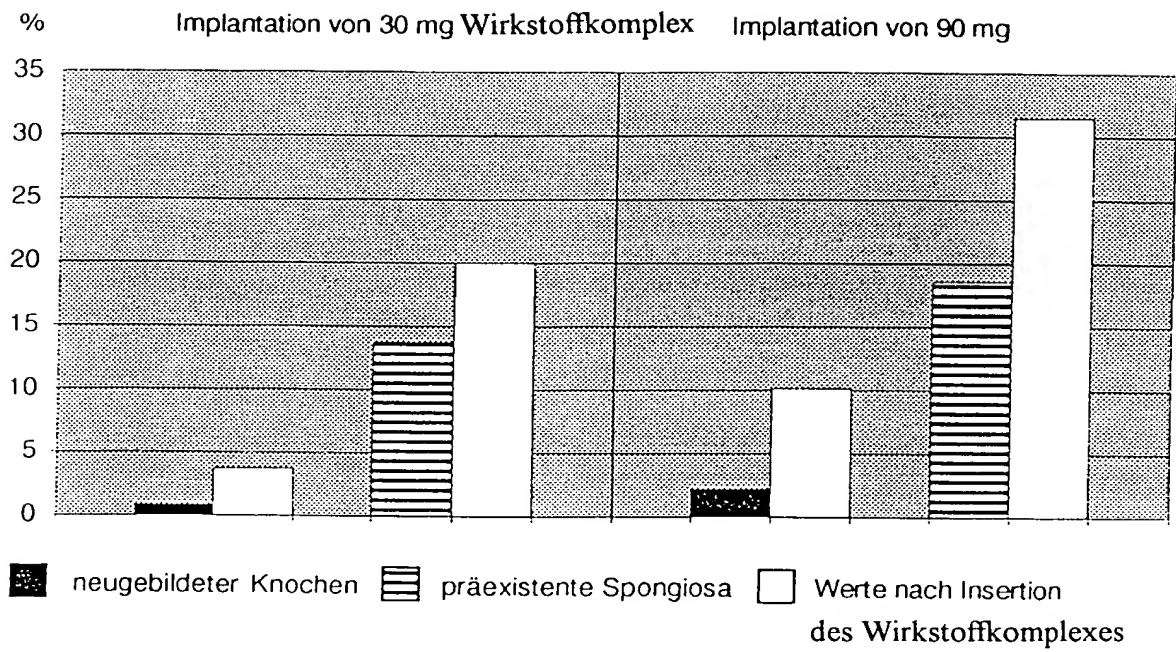
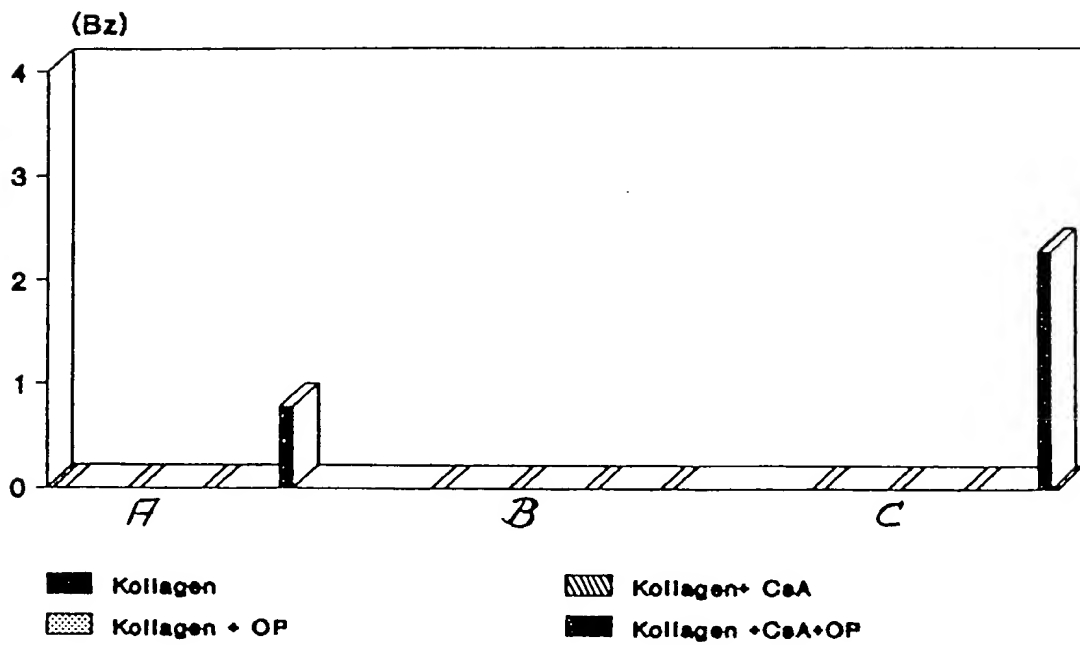


Fig. 3



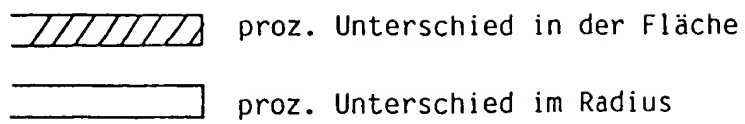


Fig. 2

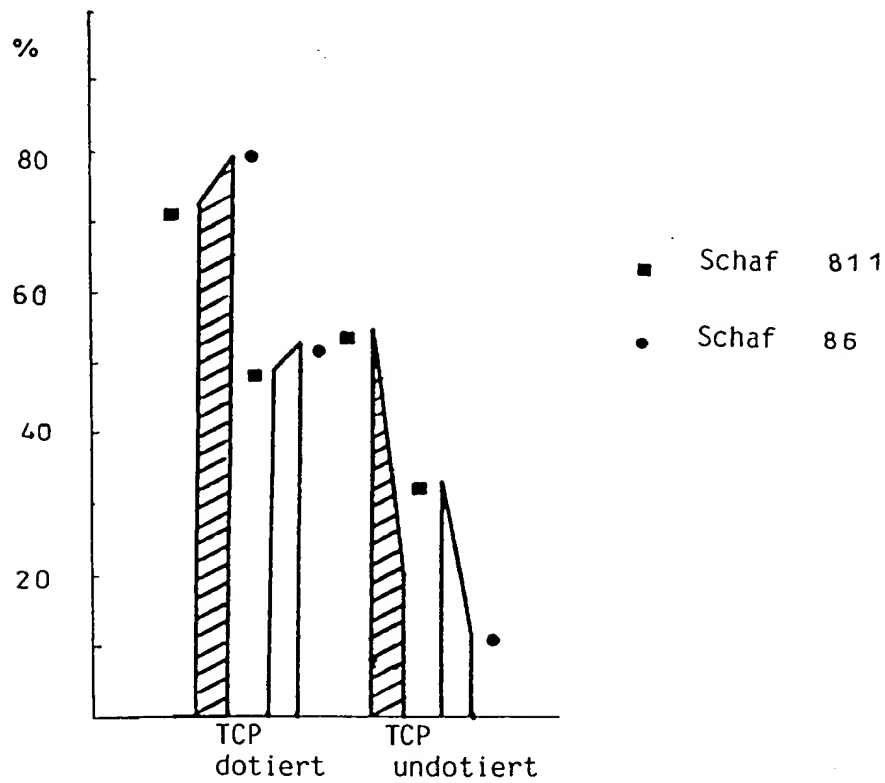


Fig. 4



Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft ein Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder
Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für
Lebewesen, bei dem ein Träger mit einem Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder
einen Wirkstoffkomplex aufweist und dieser Wirkstoffkomplex die folgenden,
voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische Teil
10 spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer
Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden
biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens
einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und
mindestens einer Wachstums- und/oder Maturationskomponente, aufweist.

15

Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Herstellung, Wiederherstellung oder
Stabilisierung von Wirbelkörpern, zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudo-
arthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur
Einheilung von Endoprothesen verwendet werden.

20

Keine Figur